пользуя бедренную и селезеночную вены с помощью роликового насоса, осуществляли сброс крови из каудальной части тела в яремную вену с заданной производительностью от 300 до 400 мл/мин.

Трансплантат располагали в ортотопической позиции в брюшной полости и первым накладывали краниальный (предпеченочный) анастомоз между полой веной реципиента (диафрагмальная часть) и донорским фрагментом того же сосуда с использованием нити «Пролен 5-0, 6-0, 7-0». Затем накладывали кава-кавальный (подпеченочный) анастомоз, восстанавливали непрерывность и кровообращение по полой вене. Анастомоз между воротной веной реципиента и воротной веной трансплантата накладывали «конец в конец» с учетом возможного несовпадения диметров и осуществляли реперфузию трансплантата. Далее проводили различные типы артериальной и билиарной реконструкции с использованием нити «Пролен 6-0, 7-0, 8-0, 9-0».

**Результат и обсуждение**

Максимальный срок наблюдения у кошек с донорской почкой на сегодняшний день составил 897 суток (два года и четыре месяца). Средний срок жизни у кошек с донорской почкой 182±50,1 дня с хорошим качеством жизни и функцией трансплантата.

У собак максимальный срок наблюдения, где в качестве доноров использовались «случайные доноры» не соответствующие породной принадлежности или родственным линиям, составил на сегодня 194, в среднем 60,6±15,2 суток.

После ортотопической трансплантации донорской печени под нашим наблюдением находились пять кошек, где максимальный срок жизни составил 18 суток и 12 суток у собаки.

Результат проведения оперативных вмешательств во многом зависел от исходного состояния реципиентов и иммунологических особенностей донора и реципиента. Эти проблемы особенно были актуальны при трансплантации донорской почки.

Сопутствующие и технические, а не иммунологические проблемы явились основной причиной гибели животных после проведения трансплантации донорской печени.

Трансплантация донорской печени благоприятна относительно иммунологических проблем, но с технической точки зрения является одной из сложнейших операций в брюшной полости. Кошки, в отличие от собак, благоприятно перенесли беспеченочный период, в то время как собакам пришлось проводить активное вено-венозное шунтирование, что усложнило технические манипуляции.

Отдаленные результаты зависели не только от исходного состояния животного, его подготовки на момент проведения оперативного вмешательства, хирургической тактики, но и, в большей степени, от ведения послеоперационного периода у животных после подобных операций.

Литература

1. Degner DA, Walshaw R, Rosenstein D. A new rapid technique for renal transplantation in the cat. Proceedings, 5th Annual Research Day, Phi Zeta, 1994.
2. Gregory CR. Renal transplantation in cats. Comp Cont Ed, 1993; 15:1325-1339
3. Lulich JP, et al. Status of renal transplantation in the 1990s. Sem in Vet Med and Surg (Sm An) 1992;7:813-186.
4. Starzl T.E. Experience in hepatic transplantation. Philadelphia 1969.

**Д.А. Глейзер, С.В. Фролов, А.В. Борисов, В.Ю. Кулаков**
*(Федеральный центр охраны здоровья животных (ФГУ ВНИИЗЖ))*

# ПОЛУЧЕНИЕ ИНАКТИВИРОВАННОГО ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА КУР (ШТАММ «КАЛУЖСКИЙ»)

**Введение**

Выбор метода инактивации вируса, т.е.- способа устранения его инфекционной способности, может в полной мере определить иммунологические свойства вакцины. Главными критериями эффективности избранного метода являются полнота и необратимость инактивации, а также - сохранение инактивированным вирусом первоначальных антигенных свойств.

Среди множества приемов необратимого воздействия на репродуктивную фун-

кцию вируса, остановимся на методах химической стерелизации и, в сравнительном аспекте, рассмотрим наиболее известные инактиванты: формальдегид, бета-пропиолактон и производные азиридинового ряда [1, 3].

Изучение инактивирующего действия формальдегида на вирус ящура показало, что данный реагент вступает во взаимодействие с многочисленными группами, обнаруженными в аминокислотах, пептидах и белках. Формальдегид оказывает сильное денатурирующее действие на белки путем образования «метиленовых мостиков» между аминогруппой и некоторыми другими группами молекул [2, 5].

Однако, устраняя инфекционную функцию вируса, формальдегид имеет и отрицательное действие. Денатурация поверхностных белков вириона может искажать устройство рецепторов вирусного капсида и тем самым снижать его антигенную специфичность. Исследования в этом направлении показали, что антигенность обработанных формальдегидом вирусных препаратов существенно снижалась [3].

Следующей группой веществ, применяемых для инактивации микроорганизмов, являются так называемые «генотоксические» соединения. Инактивирующее действие соединений этого класса состоит в взаимодействии их с компонентами генома биологического объекта, вызывая в нем необратимые структурные изменения.

Среди инактивантов генотоксического типа наиболее широкое практическое использование приобрели бета-пропиолактон и соединения азиридинового ряда (производные этилена).

Бета-пропиолактон (результат взаимодействия формальдегида ($CH_2O$) с кетеном ($CH_2$=C=O)) широко применяют в качестве инактиванта, антисептика и дезинфицирующего средства. Однако, сравнительные исследования инактивирующего действия этого соединения и некоторых азиридинов, показали, что после воздействия бета-пропиолактоном сохраняемость антигенных свойств вируса была существенно ниже. Это обстоятельство указывало на то, что данный инактивант, вероятно, изменял архитектонику структурных белков вириона.

Изучение динамики инактивирующего действия азиридинов показало, что оценки остаточной инфекционности вируса, установленные через фиксированные интервалы времени (в диапазоне до 20 часов) после воздействия таких соединений как АЭИ ЭИ и БЭИ демонстрировали распределения, близкие к логарифмически линейным. Это, в свою очередь, позволяло достаточно надежно контролировать процесс инактивации и строить несложные регрессионные модели, на основе которых прогнозировать ожидаемую остаточную концентрацию инфекционного агента, в том числе, и за пределами рамок эмпирически доступного диапазона измерений.

Важно отметить, что результаты специальных исследований антигенных свойств инактивированного производными этилена вируса ящура, относящего к различным иммунологическим типам, свидетельствовали, что препараты АЭИ, ЭИ и БЭИ минимально изменяли ответственные за антигенность белковые структуры вириона. Здесь следует добавить, что антигены, полученные как результат инактивации вируса азиридинами, значительно дольше сохраняли свои свойства при хранении [2,4].

Сравнительное исследование антигенных свойств вируса ИБК после инактивации его формалином, бета-пропиолактоном, метиленимином и этиленимином показало, что наименьшее воздействие на антигенные детерминанты вириона оказал этиленимин.

**Материалы и методы**

*Вирус ИБК (характеристика производственного штамма)*. Вакцинный производственный штамм «Калужский» вируса ИБК был паспортизирован 20.05.2005 г. в ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ ВГНКИ) и депонирован во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве. Регистрационный номер штамма «Калужский» «***№-121 ДЕП***». Местами поддержания и хранения штамма «Калужский» «***№-121 ДЕП***» определены музеи культур микроорганизмов ФГУ ВГНКИ и ФГУ ВНИИЗЖ.

При проведении опыта штамм использовали в виде суспензии экстраэмбриональной жидкости (ЭЭЖ) свободных от патогенных факторов (СПФ) эмбрионов кур. В работе использован вирус восьмого пассажа.

*Растворы и реактивы.* Все работы, связанные с получением и исследованием вируссодержащих суспензий проводили на физиологическом растворе (NaCl, 0,85%; pH 7,0÷7,2) категории «х.ч.». При необходимости в растворы добавляли гентамицин из расчета 250-500 мкг/мл.

Для инактивации инфекционности вируса ИБК использовали аминоэтилэтиленимин (АЭЭИ) производства Покровского завода биопрепаратов с содержанием основного вещества 25%. Рабочий раствор аминоэтилэтиленимина готовили путем разбавления коммерческого препарата стерильной бидистиллированной водой до 10% концентрации; pH раствора доводили до 7,4-7,6 5М уксусной кислотой. Приготовление рабочего раствора АЭЭИ проводили за 20-30 минут до внесения в вирусcодержащую суспензию.

*Контроль авирулентности антигена вируса ИБК.* Инактивированный вирус контролировали на авирулентность двукратным пассированием на развивающихся СПФ-эмбрионах кур 9-11 суточного возраста.

*Подопытная птица.* В качестве подопытной птицы использовали клинически здоровых цыплят кроссов «Хайсекс коричневый» в возрасте 90-120 суток. Эксперименты с птицей проводили на базе вивария ФГУ ВНИИЗЖ в боксовых помещениях, предназначенных для работ с особо опасными болезнями сельскохозяйственных животных.

Птиц содержали по 10-15 голов в клетках, оборудованных навесными кормушками и поилками. Рацион кормления, температурный и влажностный режимы, так же освещенность помещений в основном соответствовали зоогигиеническим нормам содержания птиц данной возрастной категории.

До эксперимента пробы сыворотки крови птиц исследовали в ИФА на присутствие антител к вирусу ИБК. Все работы проводили на птице, не имеющей иммунитета к вирусу ИБК.

*Иммуноферментный анализ (ИФА).* Сыворотки крови интактных и иммунизированных птиц исследовали в непрямом твердофазном ИФА (на планшетах с иммобилизованным антигеном). Для постановки ИФА использовали диагностические наборы фирмы KPL. В соответствии с инструкцией по использованию наборов определяли наличие антител к вирусу ИБК (положительная реакция) и, согласно приведенным формулам, оценивали величину их титра (обработку показателей оптической плотности тестируемых проб и последующие расчеты производили на совмещенном с компъютером спектрофатометре-ридре «STL», Австрия).

Реакцию считали положительной, если титр антител был равен или превосходил значение 1:800.

**Результаты и обсуждение**

Вируссодержащюю суспензию подвергали химической стерилизации с целью получения инактивированного вируса (вирусного антигена). Процедуру инактивации производили в асептических условиях в герметичной емкости (реакторе), где было обеспечено термостатирование (25±1°С) и перемешивание содержимого со скоростью около 200 об./мин. В реактор добавляли инактивант (раствор аминоэтилэтиленимина с предварительной коррекцией pH-показателя в диапазоне 7,4-7,6) из расчета создания конечной концентрации 0,05%. Продолжительность химической стерилизации вируссодержащего материала в режиме перемешивания и термостатирования составляла от 28 до 36 часов.

Конечным этапом процедуры инактивации являлась нейтрализация инактиванта. Для этого в работающий в заданном режиме реактор вносили тиосульфат натрия ($N_2S_2O_3$) из расчета эквимолярного соотношения с аминоэтилэтиленимином.

Исследовали динамику инактивации

Таблица 1

**Динамика инактивации вируса ИБК при воздействии 0,05% аминоэтилэтиленимина (n=3)**

| Титр инфекционного вируса ($lgT_{inf}$, $ЭИД_{50}/см^3$) установленный соответственно времени экспозиции в реакторе (часы) | |
|---|---|
| Часы | штамм «Калужский» |
| 0 | 7,2±0,05 |
| 4 | 6,15±0,12 |
| 8 | 5,1±0,14 |
| 12 | 4,05±0,17 |
| 16 | 3,0±0,08 |
| 20 | 1,95±0,1 |
| 24 | < |
| 28 | < |
| 32 | < |

Примечание: < - инфекционный вирус не выявлен

вируса. С этой целью определяли инфекционный титр вируссодержащей суспензии до обработки инактивантом и далее, через заданные интервалы времени, из реактора, где происходила инактивация, отбирали пробы и оценивали их остаточную ифекционность. Полученные результаты представлены в таблице 1.

В каждом эксперименте полученные текущие оценки инфекционного титра вируса ($lgT_i$ – значения, установленные на i-тый час наблюдения) нормировали по отношению к величине исходного титра ($lgT_0$) и вычисляли относительные показатели остаточной инфекционности вида $\Delta_i = lgT_i - lgT_0$. Распределение показателей $\Delta_i$ по временной оси позволяло построить достаточно адекватную ($p \leq 0{,}05$) регрессионную модель процесса.

Экспериментально установленная константа инактивации штамма «Калужский» вируса ИБК (k - коэффициент линейной регрессии показателя $\Delta_i$ для первых 20 часов экспозиции) составила значение k=(–1,05)lgЭИД$_{50}$/час. Данная величина находилась в диапазоне доверительного интервала $[(-0{,}59) \div (-0{,}70)]_{p \leq 0{,}05}$ lgЭИД$_{50}$/час. Развернутой моделью процесса было уравнение вида

$$lg'Ti = (-0{,}36)+(-k)xti, [1]$$

где:$'T_i$ – ожидаемое значение титра остаточной инфекционности; $t_i$ – заданное время воздействия инактиванта. Уравнение [1] позволило установить, что при сочетании наиболее неблагоприятных условий, а именно - наибольшем эмпирически установленном исходном титре инфекционного вируса в вируссодержащей суспензии ($T_0$=7,2 lgЭИД$_{50}$/ см$^3$) и наименьшей возможной величине константы инактивации (k=(–0,59)lgЭИД$_{50}$/час), ожидаемый показатель остаточной инфекционности через 32 часа воздействия инактиванта составит значение $'T_i$ =(-1,88)lgЭИД$_{50}$/см$^3$, т.е. приближенно 0,013 ЭИД$_{50}$/см$^3$. Полученные в эксперименте отрицательные результаты титрования 32-часовых проб косвенно подтвердили эти расчеты. Было сделано заключение, что обнаружение инфекционного вируса в такой незначительной концентрации имеющимися средствами индикации маловероятно.

Провели дополнительные опыты по определению полноты инактивации вируса. С этой целью после 32 часов воздействия инактивантом повторно оценивали остаточную ифекционность проб вируссодержащей суспензии в цельном виде и его десятикратном разведении. Для испытания каждого разведения использовали не менее 20 эмбрионов кур, которым в аллантоисную полость вносили испытуемый материал в объеме 0,2 мл. Через 7 суток экспозиции признаков развития инфекционного процесса, обусловленного вирусом ИБК, в эмбрионах не установлено. Полученной от эмбрионов экстраэмбриональной жидкостью заражали еще 20 эмбрионов кур и при отсутствии у них специфических признаков свойственных ИБК материал считали авирулентным.

Проведенный опыт по инактивации инфекционности штамма «Калужский» вируса ИБК показал эффективность данного режима. Однако, необходимо было установить антигенную активность полученных препаратов. С этой целью был изготовлен образец инактивированной вакцины против ИБК с использованием изучаемого штамма на основе адъюванта Montanide ISA-70. Антигенную активность вакцины испытывали на 40 цыплятах 90 суточного возраста, разделенных на 2 группы по 20 голов в каждой, которым препарат вводили внутримышечно в область груди в объеме 0,5 мл. Сыворотки крови птиц исследовали на присутствие антител к вирусу ИБК в ИФА до использования препарата и через 28 суток после. К началу проведения опыта вся птица должна была демонстрировать отсутствие антител к вирусу ИБК. Через 28 суток титр антител к вирусу ИБК в сыворотках крови птицы контрольной группы не должен был превышать фоно-

Таблица 2

**Показатели антигенной активности образца вакцины на основе антигена штамма «Калужский» (n=3)**

| Сутки | Титр антител к вирусу ИБК | |
|---|---|---|
| | Опытная группа | Контрольная группа |
| 0 | 0,132±0,2 | 0,148±0,5 |
| 28 | 2,436±1,6 | 0,116±0,3 |

Примечание: титр антител в ИФА × на 1000

вых значений, в сыворотках крови птицы опытной группы среднее значение должно быть не менее 1:800. Полученные данные представлены в таблице 2.

Данные таблицы 2 демонстрируют присутствие в крови птицы опытной группы антител к вирусу ИБК в защитных титрах, и, следовательно, высокую антигенную активность полученного препарата.

**Выводы**

На основании проведенных исследований можно сделать выводы:

1. Для инактивации штамма «Калужский» вируса ИБК возможно применение аминоэтилэтиленимина в заданной концентрации, температурном и временном режиме.

2. На основе полученного в данном режиме антигена возможно изготовление высокоиммуногенного вакцинного препарата для специфической профилактики ИБК.

**РЕЗЮМЕ**

**Отрабатывали методику получения инактивированного вируса инфекционного бронхита кур (ИБК) штамм «Калужский». Работа включала в себя изучение воздействия на вирус химического инактиванта (аминоэтиэтиленимин) в заданной концентрации и температурном режиме, а также оценки антигенных свойств полученных в ходе опыта образцов инактивированной вакцины.**

**SUMMARY**

**Technique for the preparation of inactivated chicken infectious bronchitis virus, «Kaluzhsky» strain, was optimized. This included examination of the effect of chemical inactivant (aminoethyleneimine) on the virus at predetermined concentration and temperature as well as evaluation of antigenic properties of samples of inactivated vaccine prepared during the experiment.**

Литература

1. Статистические методы в микробиологических исследованиях. / И. П. Ашмарин, А. А. Воробьев // Л.: Медгиз, 1962. – 180с.
2. Инфекционный бронхит кур (обзор литературы) / А. Н Куриленко, В. Л. Крупальник, Б. А. Якимчук // Ветеринария. - 1990. - №8. - С.36-43.
3. Вирусные болезни животных. / В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина // М.: ВНИТИБТ 1998. – Гл. Инфекционный бронхит кур. - С.183-198.
4. T.R Doel Inactivation of viruses produced in animal// Animal Cell Biotechnology.-London, 1985.-V.2.-P.124-149.
5. S. Gard, E Luck. Inactivation of poliovirus by formaldehyde. Analysis of inactivation curves// Arch. ges. Virus. Forsch. –1957.–V.7.-P.471-493.

УДК: 619:616.98:578.831.31:616-074

**В.Л. Гаврилова, Т.З. Байбиков**

*(Федеральное государственное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия)*

# ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИГЕНА ВИРУСА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ С ПОМОЩЬЮ НЕПРЯМОЙ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

**Введение**

Репродуктивно-респираторный синдром свиней причиняет значительный экономический ущерб свиноводству многих стран мира, поэтому, возникает необходимость своевременной постановки диагноза и проведения плановых мероприятий по профилактике и ликвидации очагов острых вспышек заболевания (3, 4, 5).

Диагностика РРСС основывается на анализе эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных и результатах лабораторных исследований (1, 2, 4). Антиген вируса РРСС выявляют в зафиксированных в формалине срезах тканей органов при помощи НРИФ и других тестов, геном вируса - в ПЦР (7, 8).

НРИФ является экспресс методом в диагностике РРСС и обладает большой чувствительностью и специфичностью. Выявление вируса РРСС при помощи НРИФ в патологических материалах с использованием перевиваемой культуры клеток позволяет протестировать большое количество проб, значительно сократить срок получения результатов, а также заметно